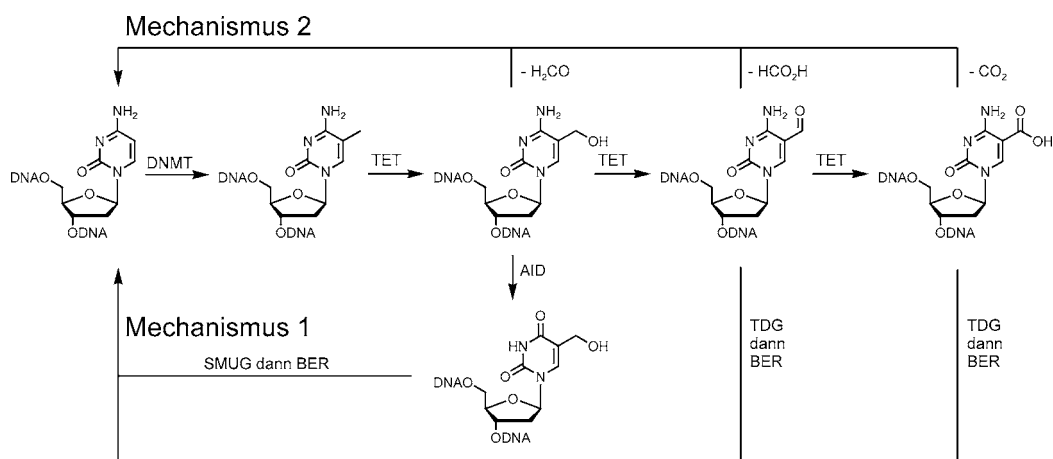


Mechanismus und Stammzellaktivität der Decarboxylierung von 5-Carboxycytosin, bestimmt mittels Isotopenverfolgung**

Stefan Schiesser, Benjamin Hackner, Toni Pfaffeneder, Markus Müller, Christian Hagemeier, Matthias Truss* und Thomas Carell*

5-Methylcytosin (mC) ist eine wichtige, gut untersuchte Nukleobase, die in vielen biologischen Prozessen, wie z.B. der Genexpression, der Genomprogrammierung, der Inaktivierung des X-Chromosoms und der Unterdrückung beweglicher Genelemente eine entscheidende Rolle spielt.^[1–3] Kürzlich wurde herausgefunden, dass mC in Neuronen und embryonalen Stammzellen durch TET-Enzyme weiter modifiziert werden kann. Die TET-Enzyme nutzen 2-Ketoglutarat, um mC zunächst zum 5-Hydroxymethylcytosin (hmC)^[4,5] und weiter zum 5-Formylcytosin (fC)^[6] und 5-Carboxycytosin (caC)^[7,8] zu oxidieren (Schema 1).^[9,10] Es wird derzeit angenommen, dass diese oxidative Chemie an einem Prozess beteiligt ist, den man aktive Demethylierung nennt. Dieser Prozess erlaubt es Zellen, das Methylcytidin durch ein unmodifiziertes 2'-Desoxycytidin (dC) zu ersetzen. Hierdurch werden die biologischen Effekte, die durch Cytosinmethylierung eingeleitet

werden, revertiert.^[11] Zwei mögliche aktive Demethylierungsmechanismen werden derzeit intensiv diskutiert (Schema 1). Mechanismus 1 (Schema 1) basiert auf speziellen Glykosylasen,^[12–15] wie z.B. der Thymin-DNA-Glycosylase (TDG), bei der kürzlich gezeigt wurde, dass diese die glykosidische Bindung von fC und caC, aber auch von 5-Hydroxymethyluridin (hmU)^[15,16] spalten kann. 5-Hydroxymethyluridin wird durch Deaminierung von hmC gebildet.^[15] Diese Glykosylaseaktivität produziert zunächst abasische



Schema 1. Aktive Demethylierungspfade, die z. B. Eliminierungsreaktionen beinhalten (Mechanismus 2). Formaldehyd kann von hmC und Ameisensäure von fC abgespalten werden, und es kann eine Decarboxylierung von caC erfolgen. Mechanismus 1 umfasst die Basenexzisionsreparatur (BER), durch die fC und caC durch dC ersetzt werden oder, nach vorhergehender Deaminierung von hmC zu hmU, hmC durch dC ersetzt wird.

[*] S. Schiesser,^[+] B. Hackner,^[+] T. Pfaffeneder, M. Müller, Prof. Dr. T. Carell
Zentrum für integrative Proteinforschung, Department für Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandtstraße 5-13, 81377 München (Deutschland)
E-Mail: matthias.truss@charite.de
thomas.carell@lmu.de

Dr. C. Hagemeier, Dr. M. Truss
Charité Universitätsklinikum, Otto-Heubner-Centrum für Kinder- und Jugendmedizin, Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Labor für Pädiatrische Molekularbiologie
Ziegelstraße 5-9, 10098 Berlin (Deutschland)

[+] Diese Autoren trugen zu gleichen Teilen zu der Arbeit bei.

[**] Wir danken dem Exzellenzcluster CiPS^M, dem SFB 749, der DFG (Einzelantrag CA275/8-4), der Volkswagen-Stiftung und NGFNplus (01GS0870) für die finanzielle Unterstützung. T.P. und S.S. danken dem Fonds der Chemischen Industrie für Promotionsstipendien.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201202583> zu finden.

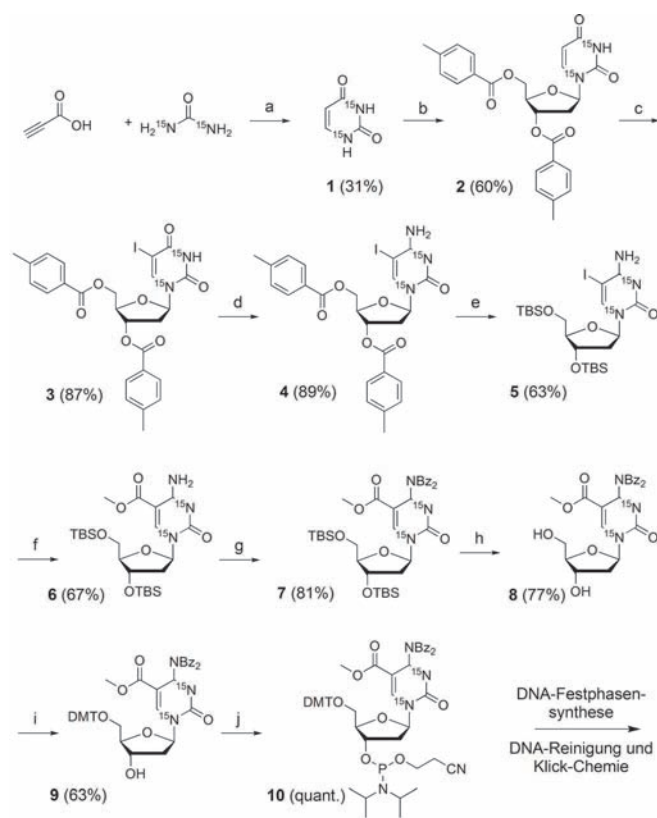
Stellen, welche dann durch das Basenexzisionsreparatursystem (BER) repariert werden, indem eine dC-Base eingebaut wird (Schema 1 unterer Teil). Der ganze Prozess führt insgesamt zu einem Austausch von mC durch dC. Der zweite Mechanismus, so glaubt man, umfasst eine Retro-Aldolartige Reaktion, die mit hmC^[17,18] oder fC beginnt. Alternativ wird eine Decarboxylierung von caC (Schema 1) als Möglichkeit formuliert. Diese Reaktionen erlauben es, mC durch dC auszutauschen, ohne dass intermediär abasische Stellen und Strangbrüche auftreten, bei denen es sich um gefährliche DNA-Schäden handelt. Darüber hinaus entsteht so kein potentiell gefährlicher Formaldehyd. Auch wenn die Decarboxylierung von caC bis heute nicht beobachtet werden konnte, sind ähnliche Transformationen von der Orotat- und Isoorotatdecarboxylase bekannt.^[19]

Um tiefere Einblicke in die mögliche Decarboxylierung von caC in Stammzellen zu erhalten, haben wir eine sensitive

Isotopenverfolgungsmethode entwickelt. Für dieses Experiment wurde das doppelt ^{15}N -markierte caC-Phosphoramidit-reagens $[\text{N}_2]_{\text{caC}}$ entwickelt. Dieses wurde in ein 30-meres Oligonucleotid **D1** mit der Sequenz des Ecot1-Promoters eingebaut.^[23] Bei diesem Promoter ist bekannt, dass aktive Demethylierung erfolgt. Das natürliche Vorkommen von doppelt ^{15}N -isotopologem dC ($[\text{N}_2]_{\text{dC}}$) ist ausgesprochen gering, was es uns ermöglicht, die an der caC-Verbindung wirkende Chemie mit hochauflösender Massenspektrometrie zu verfolgen. Die Synthese des $[\text{N}_2]_{\text{caC}}$ -Phosphoramidits ist in Schema 2 dargestellt (siehe auch Hintergrundinformationen). Ausgangspunkt ist $[\text{N}_2]_{\text{Uracil}}$ (**1**), das aus $[\text{N}_2]_{\text{Harnstoff}}$ und Propinsäure hergestellt wurde.^[20] Vorbrücken-Nukleosidierung mit dem Bis(toluoyl)-geschützten Chlor-ribofuranosid^[21] ergab das β -konfigurierte Nukleosid **2** in 60% Ausbeute. Elektrophile Iodierung zu **3**,^[22] Umsetzung der C4-Ketofunktion zu einem Amin (**4**) und Schutzgruppenaustausch lieferten das Schlüsselintermediat **5**. Pd-katalysierte CO-Insertion und anschließende Methanolyse des Pd-CO-Intermediats mit Methanol ergaben in 65% Ausbeute das $[\text{N}_2]_{\text{caC}}$ -Vorläufermolekül **6**. Nach doppelter Benzoylschutzung der C4-Aminogruppe (**7**) und Abspaltung der TBS-Gruppen (**8**) folgte die gezielte Schützung der 5'-OH-Gruppe mit Dimethoxytritylchlorid (DMT-Cl) (**9**). Anschließend wurde die 3'-OH-Gruppe mithilfe von Standardprozeduren in das finale Phosphoramidit **10** überführt. Das Phosphoramidit wurde zur Synthese der 30-meren Oligonukleotide **ODN1** und **ODN2** eingesetzt. Die zwei Stränge wurden anschließend zum Doppelstrang **D1** mit der Sequenz des Ecot1-Promoters hybridisiert, welcher nun zwei $[\text{N}_2]_{\text{caC}}$ -markierte caC-Derivate enthält.

In einen der DNA-Stränge (**ODN1**) wurde zusätzlich die Base 5-Octadienyl-dU (Schema 2, unten) eingebaut. Nachfolgend wurde milde Klickchemie mit dem dargestellten Biotinazid (Schema 2, unten und Hintergrundinformationen) durchgeführt, um den Biotinmarker mit dem Octadienyl-dU^[23] zu verknüpfen. Alle DNA-Stränge, die für die nachfolgenden Experimente benötigt wurden, wurden sorgfältig per HPLC aufgereinigt, um das markierte DNA-Material in hoher Reinheit > 99.9% zu erhalten. Nach der Durchführung der Klickchemie wurde das biotinylierte Oligonukleotid daher erneut per HPLC aufgereinigt. Die Identität der Oligonukleotide wurde in allen Fällen durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestätigt (Schema 2 und Hintergrundinformationen).

Für das Isotopenverfolgungsexperiment (Abbildung 1) wurde der DNA-Duplex **D1** (**ODN1** + **ODN2**) mit den zwei $[\text{N}_2]_{\text{caC}}$ -markierten caC-Basen und dem Biotinmarker zu nuklearem Extrakt von embryonalen Stammzellen von Mäusen (mESC) gegeben. Nach 1 h Inkubation bei 37°C (für Details siehe Hintergrundinformationen) wurde die DNA mithilfe Streptavidin-beladener magnetischer Partikel re-isoliert. Die isolierte DNA wurde anschließend vollständig verdaut (Hintergrundinformationen) und der Verdau per HPLC-MS mithilfe eines hochauflösenden Massenspektrometers (Orbitrap XL, für Details siehe Hintergrundinformationen) analysiert (Abbildung 1 b–e). Wir untersuchten zuerst die Resultate aus Kontrollexperimenten. In diesen wurde **D1** mit nuklearem Extrakt von Nichtstammzellen oder einfach mit Puffer inkubi-



ODN 1: 5'-CCT TTC CGA AGG GAC GTT GAC XGG ATG CYC-3'
ber. 9657 Da, gef. 9658 Da

ODN 2: 5'-GAG CAT CCG GTC AAC GTC CCT TXG GAA AGG-3'
ber. 9259 Da, gef. 9259 Da, X = $[\text{N}_2]_{\text{caC}}$, Y = Biotin-markiertes dU



Schemata 2. Synthese des $[\text{N}_2]_{\text{caC}}$ -markierten caC-Phosphoramidits und der DNA-Stränge **ODN1** und **ODN2** mit eingebautem $[\text{N}_2]_{\text{caC}}$ -markiertem caC. Der Biotinmarker wurde durch Anwendung von Klickchemie eingebaut. Reaktionen und Bedingungen: a) Polyphosphorsäure, 95°C, 19 h; b) 1. HMDS, TMS-Cl, 120°C, 1 h; 2. Hoffers Chlorzucker, CHCl_3 , RT, 2.5 h; c) CAN, LiI, MeCN, 80°C, 2 h; d) 1. 1,2,4-Triazol, POCl_3 , TEA, 30°C, über Nacht; 2. NH_4OH , 1,4-Dioxan, RT, 10 min; e) 1. K_2CO_3 , MeOH, RT, 19 h; 2. TBS-Cl, Imidazol, DMF, RT, 4 d; f) $[\text{Pd}(\text{MeCN})_2\text{Cl}_2]$, CO, MeOH, 60°C, 17 h; g) BzCl, Pyridin, 0°C nach RT, 19 h; h) HF-Pyridin, EtOAc, RT, 14 h; i) DMT-Cl, Pyridin, RT, 16.5 h; j) Diisopropylammoniumtetrazolid, 2-Cyanoethyl-N,N,N',N'-tetra-isopropylphosphordiamidit, DCM, RT, 17 h. HMDS = Hexamethyldisilazan, TMS = Trimethylsilyl, CAN = Cerammoniumnitrat, TEA = Triethylamin, TBS = *tert*-Butyldimethylsilyl, DMT = Dimethoxytrityl.

biert. Die massenspektrometrische Analyse dieser Kontroll-experimente zeigt, wie in Abbildung 1 d,e dargestellt ist, zwei zusätzliche Signale mit $m/z = 230.1014$ und 230.0976 im Massebereich des dC-Nukleosids (Abbildung 1 e). Diese m/z -Signale stammen von den natürlich vorkommenden Iso-

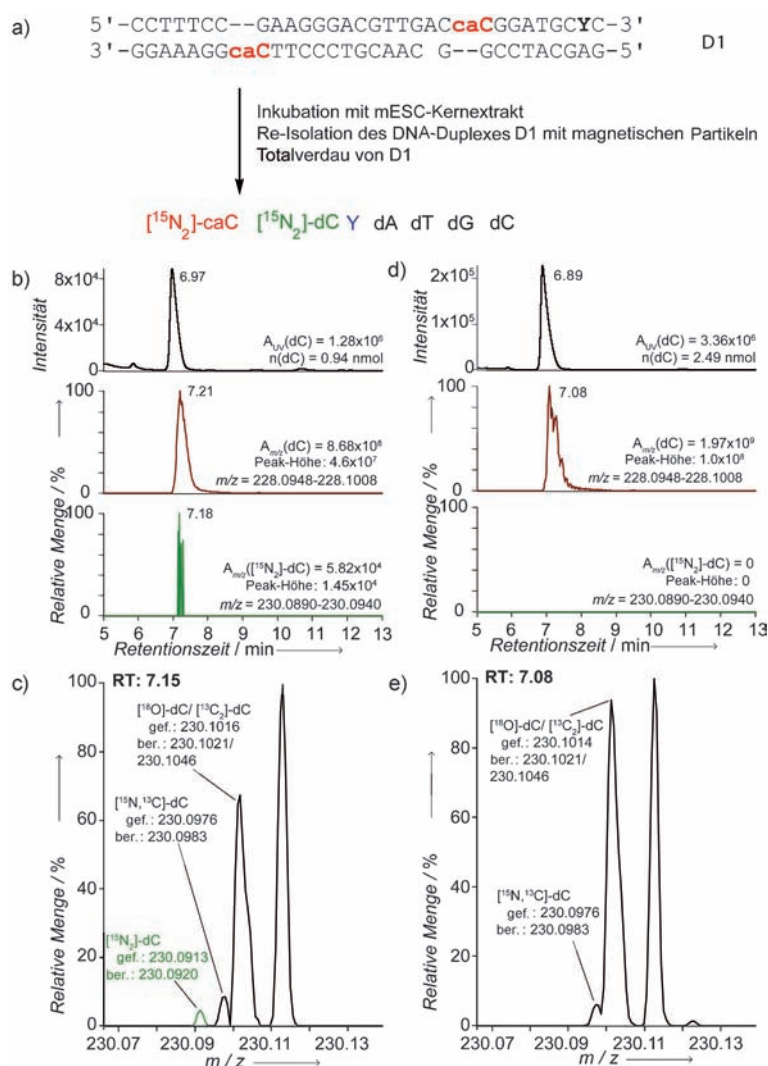


Abbildung 1. a) Darstellung des Nuklearextraktexperiments. b,d) HPLC-MS-Analyse von D1 behandelt mit mESC-Nuklearextrakt (b) und Nicht-mESC-Nuklearextrakt (d). UV-Spuren der HPLC-Messungen bei der Retentionszeit von dC (oben) sowie Massenspektren für dC (228.0948–228.1008, Mitte) und Massenspektren für [¹⁵N₂]-markiertes dC (230.0890–230.0940, unten). c,e) Hochaufgelöste Massenspektren ($m/z=230.0700\text{--}230.1300$) von D1 nach Behandlung mit mESC-Nuklearextrakt (c) und Nicht-mESC-Extrakt (e).

topologen [¹³C₂]- bzw. [¹⁸O]-dC und [¹⁵N,¹³C]-dC. Die erwartete exakte Masse für das doppelt ¹⁵N-markierte [¹⁵N₂]-dC war in allen diesen Kontrollexperimenten nicht detektierbar, auch wenn höhere Mengen an DNA für die Experimente verwendet und nachfolgend verdaut wurden (2.5 nmol dC versus 0.9 nmol dC, Abbildung 1d,e). Wir analysierten nachfolgend den Verdau, der von D1 nach Inkubation mit nuklearem Stammzellextrakt erhalten wurde. Überraschenderweise beobachteten wir schon nach 1 h der Inkubation das Auftreten von [¹⁵N₂]-markiertem dC. Diese Verbindung eluierte mit einer Retentionszeit von 7.18 min. Das erhaltene Massenspektrum zeigt die exakte Masse $m/z_{\text{gef.}} = 230.0913$ (Abbildung 1c). Das Signal ist von den Signalen der anderen natürlich vorkommenden Isotopologen [¹⁵N,¹³C]-dC ($m/z = 230.0976$) und [¹⁸O/¹³C₂]-dC ($m/z = 230.1016$) gut se-

pariert und war damit klar detektierbar. Darüber hinaus stimmten die hochaufgelösten Massedaten für die Verbindung [¹⁵N₂]-dC mit dem berechneten Wert der Verbindung [¹⁵N₂]-dC ($m/z_{\text{ber.}} = 230.0920$) überein. Diese Daten zeigen zusammen, dass mESC-Nuklearextrakt die Fähigkeit hat, caC zu dC zu decarboxylieren. Ob diese Aktivität durch ein spezifisches Enzym oder durch andere Faktoren erzeugt wird, die in den Extrakten anwesend sind, bedarf der weiteren Untersuchung.

Um die Reaktionen zu untersuchen, die es Stammzellen ermöglichen würden, caC zu decarboxylieren, erhitzen wir zunächst das caC-Nukleosid und Oligonukleotide, welche die caC-Base beinhalteten (Abbildung 2). Unter keinen Umständen konnten wir jedoch Decarboxylierung beobachten. Auch wenn wir das caC-Nukleosid in Wasser mehrere Stunden zum Rückfluss erhitzen, zeigte die massenspektrometrische Analyse der Reaktionsmischung keine Hinweise auf das Stattfinden einer Decarboxylierung (Daten nicht gezeigt). Das ist nicht überraschend, denn durch die Decarboxylierung würde ein sehr energiereiches Cytosin-Carbanionintermediat entstehen. Demgegenüber sollte die Absättigung der C5-C6-Doppelbindung mit anschließender Tautomerisierung der C4-Aminogruppe ein Iminintermediat ergeben, das als Substruktur eine β -Iminocarbonsäure aufweist. Hier sollte eine effiziente Decarboxylierung (Abbildung 2) stattfinden können.^[10,24] Um diese Idee näher zu untersuchen, reduzierten wir den 5-Carboxy-dC-methylester **11** mit NaBH₄. Die reduzierte Verbindung **12** ist stabil. Sie wurde isoliert und vollständig charakterisiert (Abbildung 2a und Hintergrundinformationen). Nachfolgende Verseifung des Methylesters führte in der Tat zu einer recht schnellen Decarboxylierung zu Verbindung **13**. Behandlung des resultierenden Dihydro-dC-Derivats mit DDQ ergab die TBS-geschützte Verbindung dC. Dieses Resultat belegt, dass die Absättigung der C5-C6-Doppelbindung für die effiziente Decarboxylierung entscheidend ist, wie es kürzlich bereits vorgeschlagen wurde.^[10] Da die Reaktion mit einer

H⁻-Spezies biologisch unwahrscheinlich ist, behandelten wir das TBS-geschützte caC nachfolgend mit einem Gemisch aus einem Thiol und Imidazol, in der Hoffnung, eine temporäre 1,4 Addition zu erreichen, welcher sich nach der Decarboxylierung eine Eliminierungsreaktion anschließen könnte. Diese chemische Kaskade wird in der Tat beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die Behandlung des caC-Nukleosids mit Octanthiol in Anwesenheit von Imidazol ergab einen neuen Fleck auf dem Dünnschichtchromatogramm. Dieser Fleck wurde nicht beobachtet in Abwesenheit von Imidazol, was zeigt, dass Protonenkatalyse für die Reaktion entscheidend ist. Die Isolierung der neuen Verbindung und ihre vollständige Charakterisierung (Hintergrundinformationen) zeigte, dass es sich bei der neuen Verbindung in der Tat um das TBS-geschützte dC handelte. Diese Verbindung wird durch De-

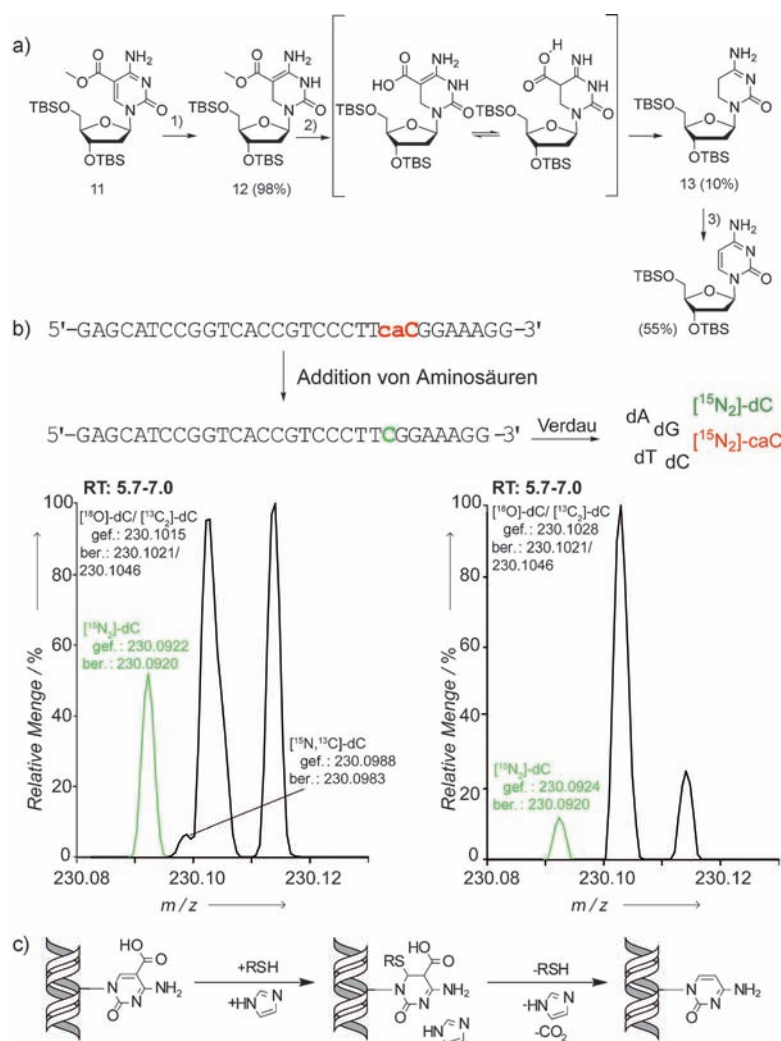


Abbildung 2. a) Reaktion von caC mit NaBH₄ ergibt Decarboxylierung: 1) NaBH₄, MeOH, RT, 20 min; 2) LiOH, MeCN/H₂O, RT, 2 h; 3) DDQ (2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon), 1,4-Dioxan, RT, 25 h. b) Behandlung von caC enthaltender DNA mit Cystein alleine oder in Kombination mit Histidin oder Arginin führt zur Decarboxylierung. Die Analyse wurde nach Totalverdau der behandelten DNA mithilfe hochauflösender HPLC-MS durchgeführt. Illustration des Mechanismus der Decarboxylierung, die durch einen nukleophilen Angriff auf die C6-Position ausgelöst wird.

carboxylierung und anschließende Eliminierung des zuvor addierten Thiols gebildet. Um zu untersuchen, ob diese Chemie kompatibel mit der Decarboxylierung von caC in Oligonukleotiden ist (Abbildung 2b,c), wendeten wir erneut die Isotopenverfolgungsmethode an. Für das Experiment inkubierten wir den [¹⁵N₂]-caC enthaltenden DNA-Strang **ODN2** mit einer Mischung verschiedener Aminosäuren. Es wurde beobachtet, dass bei Zugabe der Aminosäuren Cystein und Histidin/Arginin zu einer wässrigen Lösung von **ODN2** Decarboxylierung stattfand (Abbildung 2b). Im Fall der Oligonukleotidexperimente reichte auch Cystein alleine aus, vermutlich weil die ungeschützte Aminogruppe die Rolle des Imidazols übernehmen kann. Um die Decarboxylierung zu beweisen, wurde die DNA über Nacht behandelt und nachfolgend bis auf das Nukleosid-Niveau verdaut. Diese Mischung wurde erneut mit hochauflösender HPLC-MS unter-

sucht. Abbildung 2b (links) zeigt die Daten, die für die Cystein/Histidin-Kombination erhalten wurden. Die Daten, die in Abbildung 2b (rechts) dargestellt sind, zeigen die Resultate aus dem Cystein/Arginin-Experiment. In beiden Fällen wird das Signal für die Verbindung [¹⁵N₂]-dC mit einem *m/z*-Wert von 230.0922 klar nachgewiesen. Die Menge an decarboxyliertem Produkt nimmt mit der Menge an zugegebenen Thiol zu und betrug in unseren Fällen ca. 5 % (halbgesättigte Lösung von Aminosäuren, 50°C, über Nacht).

Zusammenfassend zeigen wir mithilfe von Isotopenverfolgungsexperimenten mit DNA-Strängen, in welche wir doppelt ¹⁵N-markiertes caC eingebaut haben, dass Stammzellextrakte die Fähigkeit haben, caC zu decarboxylieren. Chemische Modellstudien belegen, dass diese Decarboxylierung eine Absättigung der C5-C6-Doppelbindung benötigt. Eine solche Absättigung ist z.B. durch einen nukleophilen Angriff auf die elektrophile C6-Position von caC z.B. durch ein Thiol möglich. Das so an C6 umgesetzte caC wird schnell decarboxylieren und nachfolgend rearomatisieren. Wir wollen erwähnen, dass auch die Bildung von mC durch Methyltransferasen (DNMTs) einem ähnlichen Mechanismus folgt. Hier erfolgt nach dem Angriff an der C6-Position durch ein Cystein die Reaktion des Produkts mit einem CH₃⁺-Äquivalent. Darüber hinaus muss Erwähnung finden, dass DNMTs bereits mit Demethylierungen in Verbindung gebracht worden sind; so können sie aus hmC Formaldehyd eliminieren.^[17,25] Eine Decarboxylierung mithilfe von Methyltransferasen konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Eine weitere enzymatische Reaktion, bei der die Absättigung der C5-C6-Doppelbindung zu einer Decarboxylierung führt, ist im Fall der Synthese von Uracil aus Isoorotat zu beobachten. Es ist bekannt, dass diese Decarboxylierung durch das Enzym Isoorotat-Decarboxylase (IDCase) durchgeführt wird. In diesem Enzym wird der

nukleophile Angriff durch ein OH⁻ ausgeführt, das durch ein Zn²⁺-aktiviertes Wassermolekül bereitgestellt wird.^[26,27] Der hier vorgestellte chemische Mechanismus ist daher in Einklang mit anderen Enzymreaktionen. Wir glauben, dass die Decarboxylierung von caC wichtig für die aktive Demethylierung in Stammzellen ist.

Eingegangen am 3. April 2012
Online veröffentlicht am 29. Mai 2012

Stichwörter: 5-Carboxycytosin · Decarboxylierungen · Epigenetik · Isotopenmarkierung · Stammzellen

- [1] H. Cedar, Y. Bergman, *Nat. Rev. Genet.* **2009**, *10*, 295–304.
[2] M. M. Suzuki, A. Bird, *Nat. Rev. Genet.* **2008**, *9*, 465–476.

- [3] H. Sasaki, Y. Matsui, *Nat. Rev. Genet.* **2008**, *9*, 129–140.
- [4] S. Kriaucionis, N. Heintz, *Science* **2009**, *324*, 929–930.
- [5] M. Tahiliani, K. P. Koh, Y. Shen, W. A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L. M. Iyer, D. R. Liu, L. Aravind, A. Rao, *Science* **2009**, *324*, 930–935.
- [6] T. Pfaffeneder, B. Hackner, M. Truss, M. Münzel, M. Müller, C. A. Deiml, C. Hagemeyer, T. Carell, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 7146–7150; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7008–7012.
- [7] Y. F. He, B. Z. Li, Z. Li, P. Liu, Y. Wang, Q. Tang, J. Ding, Y. Jia, Z. Chen, L. Li, Y. Sun, X. Li, Q. Dai, C. X. Song, K. Zhang, C. He, G. L. Xu, *Science* **2011**, *333*, 1303–1307.
- [8] S. Ito, L. Shen, Q. Dai, S. C. Wu, L. B. Collins, J. A. Swenberg, C. He, Y. Zhang, *Science* **2011**, *333*, 1300–1303.
- [9] K. I. Ladwein, M. Jung, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 12347–12349; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12143–12145.
- [10] R. Z. Jurkowska, T. P. Jurkowski, A. Jeltsch, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 206–222.
- [11] S. K. Ooi, T. H. Bestor, *Cell* **2008**, *133*, 1145–1148; M. R. Branco, G. Ficz, W. Reik, *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13*, 7–13.
- [12] C. Popp, W. Dean, S. Feng, S. J. Cokus, S. Andrews, M. Pellegrini, S. E. Jacobsen, W. Reik, *Nature* **2010**, *463*, 1101–1105.
- [13] M. Wossidlo, J. Arand, V. Sebastiano, K. Lepikhov, M. Boiani, R. Reinhardt, H. Scholer, J. Walter, *EMBO J.* **2010**, *29*, 1877–1888.
- [14] P. Hajkova, S. J. Jeffries, C. Lee, N. Miller, S. P. Jackson, M. A. Surani, *Science* **2010**, *329*, 78–82.
- [15] S. Cortellino, J. Xu, M. Sannai, R. Moore, E. Caretti, A. Cigliano, M. Le Coz, K. Devarajan, A. Wessels, D. Soprano, L. K. Abramowitz, M. S. Bartolomei, F. Rambow, M. R. Bassi, T. Bruno, M. Fanciulli, C. Renner, A. J. Klein-Szanto, Y. Matsumoto, D. Kobi, I. Davidson, C. Alberti, L. Larue, A. Bellacosa, *Cell* **2011**, *146*, 67–79.
- [16] K. A. Haushalter, M. W. T. Stukenberg, M. W. Kirschner, G. L. Verdine, *Curr. Biol.* **1999**, *9*, 174–185.
- [17] Z. Liutkevičiūtė, G. Lukinavicius, V. Masevičius, D. Daujotytė, S. Klimašauskas, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 400–402.
- [18] Z. Liutkevičiūtė, E. Kriukienė, I. Grigaitytė, V. Masevičius, S. Klimašauskas, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 2138–2141; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2090–2093.
- [19] J. A. Smiley, M. Kundracik, D. A. Landfried, V. R. Barnes Sr., A. A. Axhemi, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2005**, *1723*, 256–264.
- [20] C. J. LaFrancois, J. Fujimoto, L. C. Sowers, *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 75–83.
- [21] G. H. Clever, C. Kaul, T. Carell, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 6340–6350; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6226–6236.
- [22] J. Asakura, M. J. Robins, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4928–4933.
- [23] G. Ficz, M. R. Branco, S. Seisenberger, F. Santos, F. Krueger, T. A. Hore, C. J. Marques, S. Andrews, W. Reik, *Nature* **2011**, *474*, 398–402; P. M. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8478–8487; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8350–8358.
- [24] N. K. Thalji, W. E. Crowe, G. L. Waldrop, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 144–152.
- [25] R. Métivier, R. Gallais, C. Tiffocche, C. Le Peron, R. Z. Jurkowska, R. P. Carmouche, D. Ibberson, P. Barath, F. Demay, G. Reid, V. Benes, A. Jeltsch, F. Gannon, G. Salbert, *Nature* **2008**, *452*, 45–50.
- [26] A. Liu, H. Zhang, *Biochemistry* **2006**, *45*, 10407–10411.
- [27] R. D. Palmatier, R. P. McCroskey, M. T. Abbott, *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 6706–6710.